谷氨酸依赖型氨基转移酶的高通量筛选方法及其应用*

贺霖伟 刘璋敏 冯雁** 崔莉**

（上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240）

摘要 目的：建立谷氨酸依赖型氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联反应的 96 孔板高通量筛选方法，并用于大肠杆菌氨基转移酶 WecE 突变库的筛选。方法：通过优化偶联指示酶-谷氨酸脱氢酶、信号分子 NADH 浓度及双酶偶联反应时间，建立了光学法测定氨基转移酶活性的氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联反应方法；通过定点饱和突变技术构建了大肠杆菌氨基转移酶 WecE 的突变库；采用 96 孔板高通量初筛、摇瓶复筛获得了高活性的转氨酶突变体，并对纯化的突变体进行催化活力分析。结果：建立了谷氨酸依赖型氨基转移酶目标反应与 0.5 U/mL L-谷氨酸脱氢酶和 0.4 mmol/L NADH 信号指示反应相偶联的筛选方法；构建了氨基转移酶 WecE Tyr 321 饱和突变库，通过 96 孔板高通量筛选，获得了催化活性比野生型提高 3.4 倍的突变体 Y321F。结论：本研究建立了高通量筛选方法，背景干扰小，准确性高，为谷氨酸依赖型氨基转移酶分子进化提供了可行性方案。

关键词 谷氨酸依赖型氨基转移酶 L-谷氨酸脱氢酶 高通量筛选 分子改造

中图分类号 Q81

氨基转移酶（Aminotransferase, EC 2.6.1.X）作为生物催化剂有高立体选择性、高区域选择性和高底物特异性等诸多优势[1]，尤其是以谷氨酸依赖型氨基转移酶，在工业上常用于催化合成重要的药物中间体。Yoshikane 等[2]以谷氨酸依赖型氨基转移酶 PPAT 生产预防和治疗糖尿病的药物吡哆胺，提高了生产效率；Cho 等[3]利用嗜热 L-氨基酸氨基转移酶，以 L-谷氨酸为氨基供体合成抗高血压药物高苯丙氨酸，降低了生产成本。然而，天然酶在催化活性及底物选择性等方面还不尽理想[4]，应用蛋白质工程技术提升对非天然底物的催化能力，将扩展其在工业生产中的应用范围。

利用定向进化或半理性分子设计所建立的大容量突变库，为获得催化性能提升的突变体奠定了基础[5]。然而常规针对氨基转移酶产物的 HPLC 等检测手段通

* 国家“973”计划资助项目（2012CB721000）
** 通讯作者，电子邮箱：yfeng2009@sjtu.edu.cn
** 通讯作者，电子邮箱：cuili@sjtu.edu.cn

量有限，极大的限制了获得突变体的效率。基于紫外/荧光等光学检测方法具有操作简便、筛选通量高等优势，得到了研究者的关注[6]。根据转氨反应中氨基供体或氨基受体的不同特点[7]，已开发了基于氨基供体邻二甲苯二胺[8]、对硝基苯乙胺[9]，或基于氨基受体丙酮酸[10]的高通量筛选方法。而针对谷氨酸依赖型氨基转移酶的高通量筛选方法目前尚未见报道。

谷氨酸依赖型氨基转移酶的氨基供体为 L-谷氨酸，在氨基转移酶作用下脱氨形成α-酮戊二酸；而 L-谷氨酸脱氢酶以α-酮戊二酸为底物，消耗 NADH 生成 NAD^+，使 340 nm 处的吸光值下降。在本研究中，我们依据氨基转移酶目标反应偶联 L-谷氨酸脱氢酶信号指示反应，能消耗 NADH 引起 340 nm 处吸光值变化的性质（图 1），建立和优化了双酶偶联的氨基转移酶高通量筛选方法，并将其应用于大肠杆菌氨基转移酶 WecE 的分子改造，为探索谷氨酸依赖型氨基转移酶的分子进化奠定了基础。

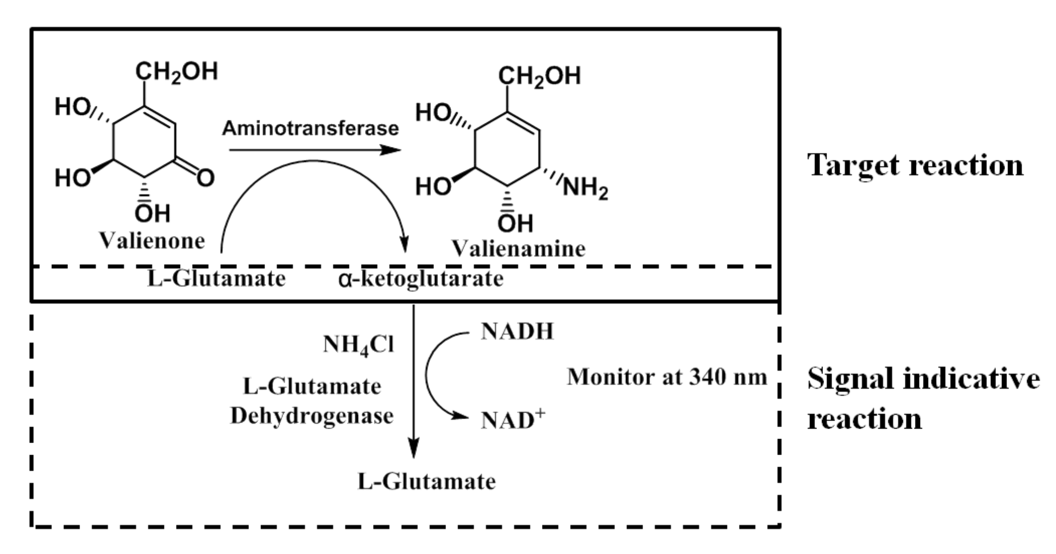


图 1 谷氨酸依赖型氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联反应

Fig.1 L-glutamate specific aminotransferase-L-glutamate dehydrogenase coupling reaction

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)、质粒 pET28a(+)购自 Novagen 公司；包含大肠杆菌氨基转移酶 *wecE* 基因的质粒 pET28a(+)-*wecE* 和 WecE Tyr 321 突变库由本实验室保存。

1.1.2 培养基

1L 自动诱导培养基中含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母粉、6 mL 甘油、0.5 g 葡萄糖、2 g 乳糖、9.0 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$、3.4 g KH_2PO_4、2.675 g NH_4Cl、0.71 g $NaSO_4$ 和 0.24 g $MgSO_4$。

1.1.3 试剂与仪器

L-谷氨酸脱氢酶（L-GDH）和邻苯二甲醛（OPA）购自 Sigma 公司；还原型辅酶 I 二钠（NADH）和磷酸吡哆醛（PLP）购自阿拉丁公司；井冈霉烯酮由药明康德公司合成；PrimeStar Max DNA 聚合酶和 DnaseI 购自 Takara 公司；限制性内切酶 *Dpn*I 购自 Thermo Fisher 公司； PCR 产物纯化试剂盒购自上海捷瑞公司。其他均为国产分析纯试剂。

多功能酶标仪（Molecular Device），微生物菌落自动筛选系统（Molecular Device），96 孔板振荡培养箱（Taitec），PCR 仪（Eppendorf），高速冷冻离心机（Hitachi），高效液相色谱系统（Agilent）。

1.2 **谷氨酸依赖型氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选方法的建立**

1.2.1 信号指示反应体系辅因子 NADH 浓度与 L-谷氨酸脱氢酶浓度的确定

取 100 μL 终浓度为 0.2 mmol/L、0.4 mmol/L 和 0.8 mmol/L 的 NADH 溶液（50 mmol/L PBS，pH 7.5），在 96 孔板中测定 340 nm 处吸光值，确定 NADH 最佳指示浓度。

在 100 μL 底物溶液中（0.4 mmol/L NADH、2.5 mmol/L NH_4Cl、50 μmol/L α-酮戊二酸、50 mmol/L PBS，pH 7.5）分别加入 0.2 U/mL、0.5 U/mL 和 1 U/mL L-谷氨酸脱氢酶，于 25℃测定 340 nm 处吸光值在 5 min 内的变化，确定信号指示酶的浓度。

1.2.2 α-酮戊二酸检测限的确定

在 100 μL 反应体系中（0.5 U/mL L-谷氨酸脱氢酶、0.4 mmol/L NADH、2.5 mmol/L NH_4Cl、50 mmol/L PBS，pH 7.5）分别加入 20 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L 和 500 μmol/L α-酮戊二酸。于 25℃测定 340 nm 处吸光值在 5 min 内的变化。

1.2.3 L-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选方法背景干扰的测定

将带有 *wecE* 基因的重组菌接入微孔板 A-D 行，将不含 *wecE* 基因的空白菌

接入微孔板 E-H 行。参照 1.3.2 和 1.2.4 中的方法进行微孔板培养和活力检测，比较重组菌和空白菌偶联反应速率差异，测定筛选方法应用于 WecE 分子改造时的背景干扰。

1.2.4 L-谷氨酸脱氢酶偶联筛选方法

在 96 孔浅孔板中进行转氨反应，50 μL 反应体系中含 0.5 mmol/L 井冈霉烯酮、0.1 mmol/L 磷酸吡哆醛、20 mmol/L L-谷氨酸和 35 μL 粗酶液，37℃培养箱中反应 1 h。加入 L-谷氨酸脱氢酶进行检测，100 μL 反应体系中含 0.5 U/mL L-谷氨酸脱氢酶、0.4 mmol/L NADH、2.5 mmol/L NH_4Cl 和 50 μL 转氨反应液，在酶标仪上检测 5 min 内 340 nm 处吸光值的变化。

1.3 大肠杆菌氨基转移酶 WecE 的分子改造

1.3.1 大肠杆菌氨基转移酶 WecE 定点饱和突变库的构建

以 pET28a(+)-*wecE* 质粒为模板，在 Tyr 321 位点设计简并引物（Y321-F: GGTGTTTCATNNKATTCCGCTGC, Y321-R: GCAGCGGAATMNNATGAAACACC，下划线为改变的密码子，N 代表 A/T/C/G，K 代表 G/T，M 代表 A/C），全质粒 PCR 构建定点饱和突变库，将扩增得到的片段经 *Dpn*I 处理除去模板质粒后转化大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)。

1.3.2 微孔板培养和菌体破碎

将突变体单菌落接种于 96 孔浅孔板（200 μL LB 培养基/孔，卡那霉素终浓度 50 μg/mL），37℃，400 rpm 培养 12 h。转接 50 μL 过夜培养的菌液至 96 孔深孔板（1 mL 自动诱导培养基/孔，卡那霉素终浓度 50 μg/mL），37℃，400 rpm 培养 4 h 后，于 25℃诱导表达 20 h。4000 rpm，4℃离心 30 min 收菌，将深孔板储存于-80℃冰箱备用。浅孔板中加入 50 μL 60%甘油，置于-80℃冰箱作为母板保存。

采用溶菌酶法破碎菌体。将深孔板在-80℃冰箱中放置 2 h，室温放置 1 h，重复以上操作两次。每孔加入 70 μL 溶菌缓冲液（0.5 mg/mL 溶菌酶、0.7 U/mL DnaseI、50 mmol/L PBS，pH 7.5）重悬菌体，并转移至新的 96 孔浅孔板，于 37℃培养箱中放置 90 min，使菌体充分破碎。4000 rpm，4℃离心 30 min，小心吸取 35 μL 上清酶液至新的 96 孔浅孔板，参照 1.2.4 方法测定突变体活力。

1.4 突变体表达纯化和酶学性质表征

1.4.1 突变体表达纯化

将培养 12 h 的突变体种子液按照 1%的接种量转接至装有 250 mL LB 培养基（卡那霉素终浓度 50 μg/mL）的摇瓶中。37℃，220 rpm 培养至 OD_{600} 约 0.6~0.8，加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG，于 25℃，220 rpm 诱导表达 8 h。6000 rpm，4℃离心 15 min 收菌。Ni-NTA 亲和层析纯化目的蛋白，考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

1.4.2 突变体催化活力验证

采用 50 μL 含 5 mmol/L 井冈霉烯酮、0.1 mmol/L 磷酸吡哆醛、20 mmol/L L-谷氨酸和 6 mg/mL 酶液的催化体系。37℃水浴反应 1 h，加入 50 μL 甲醇终止反应，采用浓度为 0.15 mol/L 邻苯二甲醛（OPA）柱前在线衍生化方法进行检测[11]，验证突变体催化活力。

2 结果与讨论

2.1 谷氨酸依赖型氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选方法的建立

2.1.1 信号指示反应体系辅因子 NADH 浓度与 L-谷氨酸脱氢酶浓度的确定

不同 NADH 起始浓度和 L-谷氨酸脱氢酶偶联浓度，是光学信号检测的影响因素，优化 NADH 起始浓度和 L-谷氨酸脱氢酶偶联浓度，可以提高筛选的准确性，降低干扰。当 NADH 浓度为 0.2 mmol/L、0.4 mmol/L 和 0.8 mmol/L 时，对应的吸光值为 0.4、0.7 和 1.1[图 2（a）]。根据朗伯比尔定律，吸光值在 0.2~0.8 范围内误差较小，因此我们选择 0.4 mmol/L NADH 进行 L-谷氨酸脱氢酶偶联检测。

我们比较了不同浓度条件下 L-谷氨酸脱氢酶对反应速率的影响[图 2（b）]。在 0.2 U/mL、0.5 U/mL 和 1 U/mL L-谷氨酸脱氢酶催化下，反应速率分别为 6.3 mAbs/min、15.2 mAbs/min 和 28.6 mAbs/min。0.2 U/mL L-谷氨酸脱氢酶催化条件下，反应速率过慢，易受 NADH 自分解和菌体蛋白消耗等背景干扰的影响；而 1 U/mL 催化条件下，过快的反应速率将影响 96 孔板筛选时的平行性； 因此我们选择背景干扰小，样品平行性好的 0.5 U/mL L-谷氨酸脱氢酶进行高通量筛选。

2.1.2 α-酮戊二酸检测限的确定

α-酮戊二酸的检测限决定了其在谷氨酸依赖型氨基转移酶高通量筛选的应用范围。由图 2（c）可知，在底物浓度为 20 μmol/L~500 μmol/L 时，v^{-1} 与$[S]^{-1}$ 呈良好的线性关系。L-谷氨酸脱氢酶最低可以检测 20 μmol/L α-酮戊二酸，本方

法灵敏度高，可以用于原始催化活力较低的氨基转移酶的筛选。

2.1.3 目标转氨反应时间的确定

对于活力相对较低的氨基转移酶，产物α-酮戊二酸的生成速度较慢，需要先将转氨反应产物浓度积累至偶联信号的检测阈值。微孔板培养条件下，WecE 的表达量为 0.5 mg/mL。利用 2.1.2 中 L-谷氨酸脱氢酶反应速率与α-酮戊二酸浓度的拟合方程，测定了 0.5 mg/mL WecE 的转氨反应时间进程（0.5 h、1 h 和 2 h）。图 2（d）结果表明，在转氨反应 30 min 时产物α-酮戊二酸的含量为 22 μmol/L，1 h 为 47 μmol/L，说明反应 1 h 内，α-酮戊二酸的增加量与反应时间成线性关系，转氨反应保持一定的速率进行。转氨反应进行 1 h 产物α-酮戊二酸的浓度达到高通量筛选方法的检测限，选择 1 h 作为后续高通量筛选过程中的目标转氨反应时间。

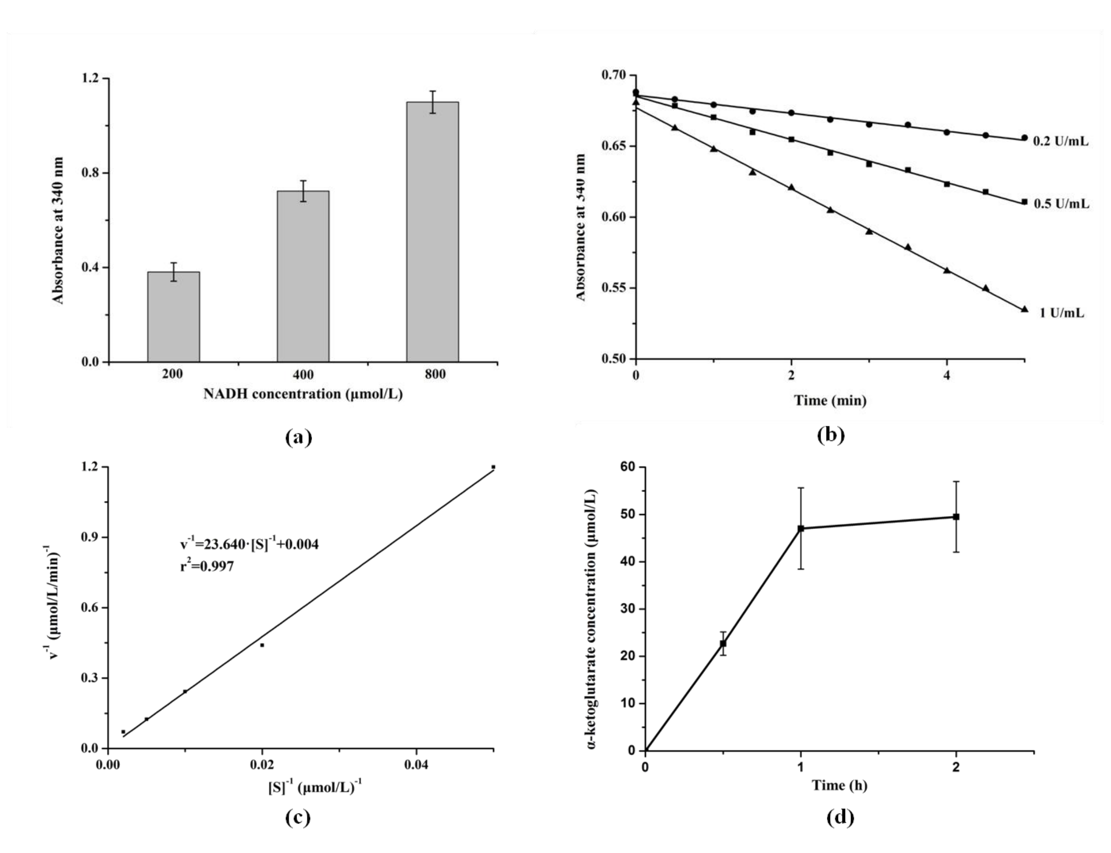


图 2 影响谷氨酸依赖型氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联检测体系的各因素

Fig.2 Factors that affect L-glutamate specific aminotransferase-L-glutamate dehydrogenase coupling detection system

(a) Absorbance at 340 nm of NADH under different initial concentration; (b) The reaction rate of L-glutamate dehydrogenase under different enzyme loading. (●) 0.2 U/mL, (■) 0.5 U/mL and (▲) 1 U/mL; (c) Limit of detection of L-glutamate dehydrogenase by double reciprocal plot; (d) The timeline curve of target transamination reaction.

2.1.4 微孔板筛选背景干扰

为了考察菌体蛋白和内源α-酮戊二酸对谷氨酸依赖型氨基转移酶-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选的影响，我们比较了重组菌与空白菌对应的 L-谷氨酸脱氢酶反应速率差异。含有 *wecE* 基因的重组菌所对应的 L-谷氨酸脱氢酶反应速率为 15.6 mAbs/min，而不含 *wecE* 基因的空白菌对应的反应速率为 5.8 mAbs/min，因此重组菌对应的反应速率是空白菌的三倍，空白对照干扰较小，WecE 催化转氨反应生成的α-酮戊二酸是筛选方法中光学信号的首要因素。利用 L-谷氨酸脱氢酶偶联筛选方法可以有效地识别催化活性提高的突变体产生α-酮戊二酸水平的变化，达到高通量筛选的目的。

2.2 氨基转移酶突变库的建立与筛选

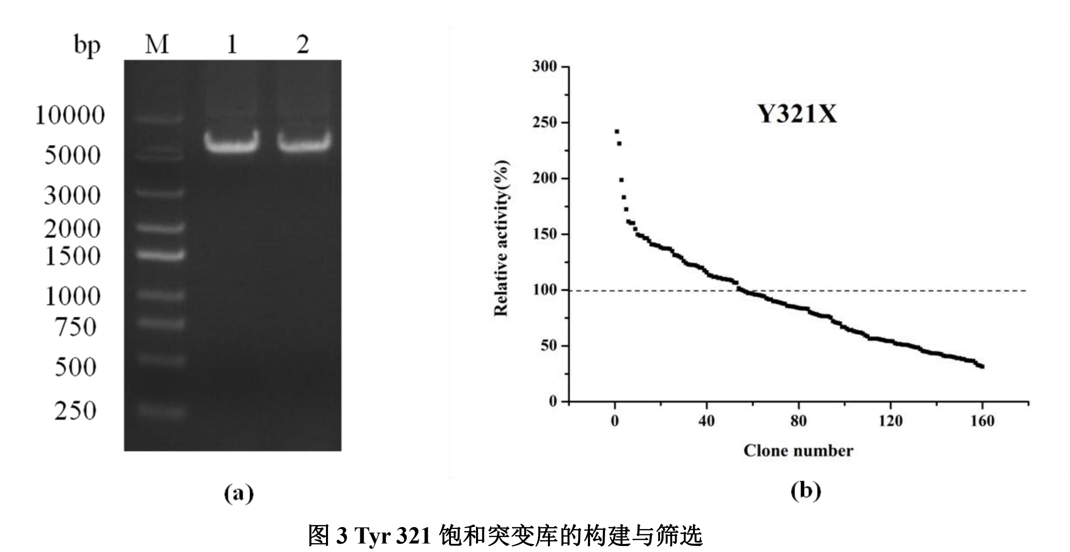
WecE 催化的天然底物为 TDP-4-羰基-6-脱氧-D-葡萄糖，其晶体结构[12]中 Loop 9（Val318-Ile322）形成了天然底物核苷结合口袋，是影响其底物识别的关键区域。其中 321 位的酪氨酸与外醛亚胺过渡态中磷酸吡哆醛 C5 的羟基形成氢键相互作用，是影响催化活力的关键氨基酸残基。我们选取 Tyr 321 构建定点饱和突变库，应用 L-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选方法对大肠杆菌糖氨基转移酶 WecE 进行分子改造。

以 Y321-F 和 Y321-R 为上下游引物，pET28a(+)-*wecE* 质粒为模板，全质粒 PCR 扩增构建定点饱和突变库。电泳结果如图 3（a）所示，在 6000 bp 左右位置有清晰的目的条带，大小与预测一致。为了使筛选过程中有 95%的几率覆盖所有 20 种氨基酸[13]，我们在定点饱和突变库中挑取 180 个单克隆至 96 孔板中进行培养。

为了检测突变对酶活性的影响，我们以微孔板中野生型 WecE 对应的 L-谷氨酸脱氢酶反应速率为催化活力参照，设置为 100%，探究 Y321X 突变对于催化活性的影响[图 3（b）]。Y321X 饱和突变库中，有 10%突变体的催化活力是野生型的 1.5 倍，是潜在的优良突变体；50%突变体的催化活力基本没有改变；40%突变体的催化活力出现了明显的下降，这表明 Tyr 321 位点突变后对酶活力有着较为显著的影响，在 WecE 催化转氨反应的过程中发挥了重要作用。

我们将微孔板中野生型对应的 L-谷氨酸脱氢酶反应速率的 1.5 倍作为筛选阈值，找到所有催化活性提高的突变体，富集到新的微孔板中再次进行筛选。结果

显示 Y321X 饱和突变库中发现了一个活性提高的突变体。经测序分析为 Y321F。



(a) (b)

图 3 Tyr 321 饱和突变库的构建与筛选

Fig.3 The construction and screening of Tyr 321 site-directed saturation mutagenesis

(a) PCR products of site-directed saturation mutagenesis in Tyr 321. M: 10 kb DNA Marker; Lane 1-2: PCR products; (b) The screening result in Tyr 321 site-directed saturation mutagenesis.

2.4 突变体催化活力表征

为了比较突变体 Y321F 与野生型催化活性的差异，我们在 500 mL 摇瓶中对突变体和野生型进行了诱导表达和蛋白纯化。SDS-PAGE 结果如图 4（a）所示，突变体 Y321F 与野生型 WecE 均得到了有效的纯化，纯度在 95%以上，且蛋白分子量与理论值一致（约为 42 kDa）。

通过高效液相色谱测定反应产物井冈霉烯胺的浓度，表征突变体与野生型的催化活力[图 4（b）]。突变体 Y321F 催化得到 0.62 mg/L 井冈霉烯胺，野生型则得到 0.14 mg/L 井冈霉烯胺，因此突变体催化活力相比野生型提高了 3.4 倍，与微孔板筛选结果一致。这表明 L-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选方法可以较为准确地筛选到对非天然底物井冈霉烯酮催化活力明显提升的突变体。

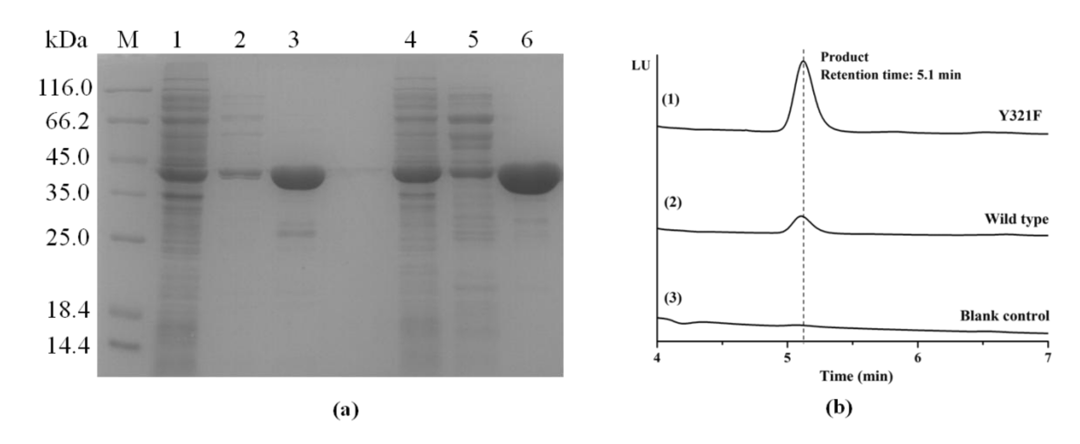


图 4 野生型与突变体蛋白的表达纯化与性质表征

Fig.4 The purification and characterization of mutant protein and wild type protein

(a) SDS-PAGE analysis of expression and purification of mutant Y321F and wild type. M: Protein molecular weight standard; 1: The lysate supernatant of wild type protein; 2: Elution of wild type protein with 50 mmol/L imidazole; 3: Elution of wild type protein with 200 mmol/L imidazole; 4: The lysate supernatant of mutant protein; 5: Elution of mutant protein with 50 mmol/L imidazole; 6: Elution of mutant protein with 200 mmol/L imidazole; (b) HPLC analysis of reaction mixture catalyzed by mutant Y321F and wild type. 1: HPLC analysis of reaction mixture catalyzed by mutant Y321F; 2: HPLC analysis of reaction mixture catalyzed by wild type; 3: HPLC analysis of reaction mixture without enzyme as blank control.

3 结论

本研究针对谷氨酸依赖型氨基转移酶建立了 L-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选方法并优化了偶联检测条件。根据朗伯比尔定律，在 0.2~0.8 范围内的吸光值是光学信号的可信区间，对不同浓度 NADH 的吸收信号比较发现，0.4 mmol/L 的 NADH 在 340 nm 处的吸光值为 0.7，能够在确保检测结果准确性的前提下使突变体的筛选范围最大化；L-谷氨酸脱氢酶偶联浓度影响偶联反应速率和偶联信号的强度，我们对 L-谷氨酸脱氢酶的偶联浓度进行了优化，确定了 L-谷氨酸脱氢酶偶联浓度为 0.5 U/mL 时背景干扰小、样品平行性好。该筛选方法准确，灵敏，α-酮戊二酸最低检测限达到 20 μmol/L，可以应用于原始催化活力较低的氨基转移酶的筛选。

我们应用该筛选方法，对大肠杆菌氨基转移酶 WecE 进行了分子改造。选择了 1 h 作为转氨偶联时间。背景干扰实验结果表明，该筛选方法空白对照的干扰较小，WecE 催化的转氨反应是筛选过程的限速步骤。构建并筛选 Tyr321 定点饱和突变库，有 50%突变体的催化活力出现了明显的提高或降低，表明该残基对催化过程发挥着重要的作用。复筛后我们挑选到一株催化活性明显改善的突变体 Y321F，对其进行表达纯化和性质表征后，发现催化活力相比野生型提高了 3.4

倍。

本研究初步应用 L-谷氨酸脱氢酶偶联高通量筛选方法，对谷氨酸依赖型氨基转移酶 WecE 进行了分子改造，对其工业化应用有着重要的研究意义。

参考文献

[1] Taylor P P, Pantaleone D P, Senkpeil R F, et al.Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases.Trends in biotechnology, 1998, 16(10):412-418.

[2] Yu Y, Tamura A, Yokochi N, et al.Engineering Mesorhizobium loti pyridoxamine–pyruvate aminotransferase for production of pyridoxamine with l -glutamate as an amino donor.Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 67(1–2):104-110.

[3] Cho B K, Seo J H, Kim J, et al.Asymmetric synthesis of unnatural L-amino acids using thermophilic aromatic L-amino acid transaminase.Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2006, 11(4):299-305.

[4] Chica R A, Doucet N, Pelletier J N.Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design.Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16(4):378-384.

[5] Wenda S, Illner S, Mell A, et al.Industrial biotechnology—the future of green chemistry?.Green Chemistry, 2011, 13(11):3007-3047.

[6] Han X, Bao Z, Zhao H.High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution. .Industrial & Engineering Chemistry Research, 2015, 54(16):4011-4020.

[7] Mathew S, Shin G, Shon M, et al.High throughput screening methods for ω-transaminases.Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(1):1-7.

[8] Green A P, Turner N J, O'Reilly E.Chiral Amine Synthesis Using ω-Transaminases: An Amine Donor that Displaces Equilibria and Enables High-Throughput Screening.Angewandte Chemie International Edition, 2015, 126(40):10890-10893.

[9] Baud D, Ladkau N, Moody T S, et al.A rapid,sensitive colorimetric assay for the high-throughput screening of transaminases in liquid or solid-phase.Chemical

Communications, 2015, 51(97):17225-17228.

[10] Truppo M D, Turner N J, Rozzell J D.Efficient kinetic resolution of racemic amines using a transaminase in combination with an amino acid oxidase.Cheminform, 2009, 40(33):2127-2129.

[11] Cui L, Zhu Y, Guan X, et al.De Novo Biosynthesis of β-Valienamine in Engineered Streptomyces hygroscopicus 5008.ACS synthetic biology, 2016, 5(1):15-20.

[12] Wang F, Singh S, Xu W, et al.Structural Basis for the Stereochemical Control of Amine Installation in Nucleotide Sugar Aminotransferases.ACS chemical biology, 2015, 10(9):2048-2056.

[13] Reetz M T, Kahakeaw D, Lohmer R.Addressing the Numbers Problem in Directed Evolution.Chembiochem : a European journal of chemical biology, 2008, 9(11):1797-1804.

High Throughput Screening Method and Application for L-glutamate Specific Aminotransferase

HE Lin-wei LIU Zhang-ming FENG Yan CUI Li

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200240, China)

Abstract Objective: The aims are to establish L-glutamate specific aminotransferase -L-glutamate dehydrogenase coupling 96-well high throughput screening method, which is applied to molecular evolution of aminotransferase WecE from *E.coli*. Methods: An optical assay for aminotransferase catalytic activity based on aminotransferase-glutamate dehydrogenase coupling system is established by optimization of coupling enzyme loading, signal molecule NADH concentration and coupling time. Mutants library of WecE is obtained by site-directed saturation mutagenesis. Positive mutants can be screened out through 96-well preliminary screening and flask second screening. Results: The target transamination reaction is coupled with L-glutamate dehydrogenase indicative reaction system which consists of 0.5 U/mL enzyme loading and 0.4 mmol/L NADH. A positive mutant Y321F whose catalytic activity increases 3.4 fold compared to that of wild type is screened out in Tyr 321 saturation mutagenesis library of WecE. Conclusion: An accurate high throughput screening method with weak background interference is established. It offers feasible

solution for molecular evolution of L-glutamate specific aminotransferase.

Key words L-glutamate specific aminotransferase, L-glutamate dehydrogenase, High throughput screening, Molecular evolution